



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</b>  <b>A61K 35/78</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 90/13304</b>  <b>(43) Date de publication internationale:</b> 15 novembre 1990 (15.11.90)									
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR90/00200  <b>(22) Date de dépôt international:</b> 23 mars 1990 (23.03.90)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> <table border="0"> <tr> <td>89/06282</td> <td>12 mai 1989 (12.05.89)</td> <td>FR</td> </tr> <tr> <td>89/07654</td> <td>9 juin 1989 (09.06.89)</td> <td>FR</td> </tr> <tr> <td>89/13297</td> <td>11 octobre 1989 (11.10.89)</td> <td>FR</td> </tr> </table>  <b>(71)(72) Déposants et inventeurs:</b> CARIEL, Léon [FR/FR]; 43, rue Raffet, F-75016 Paris (FR). JEAN, Daniel [FR/FR]; Rue de la Chaussade, F-63270 Vic-le-Comte (FR).  <b>(74) Mandataires:</b> DESAIX, Anne etc. ; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 67, bd Haussmann, F-75008 Paris (FR).		89/06282	12 mai 1989 (12.05.89)	FR	89/07654	9 juin 1989 (09.06.89)	FR	89/13297	11 octobre 1989 (11.10.89)	FR	<b>(81) Etats désignés:</b> AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), BF (brevet OAPI), BJ (brevet OAPI), CA, CF (brevet OAPI), CG (brevet OAPI), CH (brevet européen), CM (brevet OAPI), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GA (brevet OAPI), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), ML (brevet OAPI), MR (brevet OAPI), NL (brevet européen), SE (brevet européen), SN (brevet OAPI), TD (brevet OAPI), TG (brevet OAPI), US.  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
89/06282	12 mai 1989 (12.05.89)	FR									
89/07654	9 juin 1989 (09.06.89)	FR									
89/13297	11 octobre 1989 (11.10.89)	FR									
<b>(54) Title:</b> PROANTHOCYANIDOL-BASED COMPOSITION AND ITS PHARMACOLOGICAL APPLICATION  <b>(54) Titre:</b> COMPOSITION A BASE DE PROANTHOCYANIDOLS; LEUR APPLICATION PHARMACOLOGIQUE  <b>(57) Abstract</b>  <p>The invention relates to a proanthocyanidol-based composition, notably of vegetable origin, characterized by a weight ratio of at least 50 % in molecules having an apparent molecule weight greater than 2000, said proportion being made up of at least 40 % proanthocyanidols, their percentage being expressed as a tannate function, and by the fact that said composition is essentially free from aromatic essences, in particular essential oils, of resins and other lipophilic substances; of polymerized sugars such as starch, gums, and cellulose derivatives; of oligomer sugars, such as saccharose, glucose, and fructose. The invention also relates to the use of said composition in pharmaceutical compositions.</p> <b>(57) Abrégé</b>  <p>L'invention concerne une composition à base de proanthocyanidols, notamment d'origine végétale, caractérisée par une proportion pondérale d'au moins 50 % de molécules ayant des poids moléculaires apparents supérieurs à 2000, cette proportion étant constituée d'au moins 40 % de proanthocyanidols, ce pourcentage étant exprimé en fonction tannante, et en ce que ladite composition est essentiellement exempte: d'essences aromatiques et notamment d'huiles essentielles, de résines et autres substances lipophiles; de sucres polymérisés tels que l'amidon, les gommes, les dérivés cellulotiques; de sucres oligomères tels que le saccharose, le glucose, le levulose. Elle vise aussi l'application de cette composition dans des compositions pharmaceutiques.</p>											

### DESIGNATIONS DE "DE"

Jusqu'à nouvel avis, toute désignation de "DE" dans toute demande internationale dont la date de dépôt international est antérieure au 3 octobre 1990 a effet dans le territoire de la République fédérale d'Allemagne à l'exception du territoire de l'ancienne République démocratique allemande.

#### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MC	Monaco
AU	Australie	FI	Finlande	MG	Madagascar
BB	Barbade	FR	France	ML	Mali
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	HU	Hongrie	NO	Norvège
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	LU	Luxembourg	TO	Togo
DK	Danemark			US	Etats-Unis d'Amérique

COMPOSITION A BASE DE PROANTHOCYANIDOLS. LEUR  
APPLICATION PHARMACOLOGIQUE

-----

L'invention concerne des compositions à base de proanthocyanidols ainsi que leur application dans des compositions pharmaceutiques.

Les Proanthocyanidols appartiennent à la famille des polyphénols connus pour leurs facultés de se fixer, à des degrés très divers, sur les protéines.

Les polyphénols participent de façon générale à la formation de tanins présents notamment chez certains végétaux.

L'invention se rapporte à des compositions contenant des classes spécifiques de tanins, appelés tanins catéchiques (synonyme de proanthocyanidols ou procyanidols). Elle se rapporte plus précisément à des polymères de tanin catéchique.

D'une façon générale on connaissait jusqu'à présent la capacité de certains extraits bruts de végétaux comprenant divers tanins, de présenter une activité antiseptique, voire quelquefois anti-virale.

Certains tanins présents sous forme d'oligomères, étaient utilisés pour leurs propriétés veinotoniques. Jusqu'à présent, les tanins catéchiques ou autres, pharmaceutiquement utilisables étaient en général constitués par des oligomères (de poids moléculaires généralement inférieurs à 1000). On écartait systématiquement les tanins de poids moléculaires (PM) élevés, notamment les polymères. Par exemple, on rappelle que pour les tanins galliques (autre famille de tanins présents par exemple chez les végétaux) la cytotoxicité augmente avec le poids moléculaire, ce qui ne favorise pas leur utilisation.

Les inventeurs ont maintenant constaté que des tanins catéchiques de poids moléculaire élevé, se

présentant sous la forme de polymères, peuvent s'avérer intéressants pour leurs propriétés pharmacologiques.

L'invention concerne à cet égard une composition à base de proanthocyanidols, notamment d'origine végétale, caractérisée par une proportion pondérale d'au moins 50% de molécules ayant des poids moléculaires apparents supérieurs à 2000, cette proportion étant constituée d'au moins 40% de proanthocyanidols, ce pourcentage étant exprimé en fonction tannante, et en ce que ladite composition est essentiellement exempte:

- d'essences aromatiques et notamment d'huiles essentielles, de résines et autres substances lipophiles,
- de sucres polymérisés tels que l'amidon, les gommes, les dérivés cellulosiques,
- de sucres oligomères tels que le saccharose, le glucose, le levulose.

Des méthodes particulièrement adaptées pour la sélection de compositions comprenant des proanthocyanidols et répondant à la définition ci-dessus sont par exemple les suivantes:

a/ Pour caractériser le niveau de la fonction tannante des proanthocyanidols des compositions ci-dessus, on pourra mettre en oeuvre le dosage suivant qui comprend d'une part un dosage de la fonction polyphénolique, d'autre part, un dosage de la fonction tannante.

1°/ -Dosage de la fonction polyphénolique:

Dans ce dosage on utilise la propriété des polyphénols de réduire l'acide phosphotungstique. Le dosage est réalisé selon les normes de la pharmacopée française 9<sup>e</sup> édition.

Réactif phosphotungstique (A):

## 3

On chauffe à reflux 10g de tungstate de sodium avec 8ml d'acide orthophosphorique et 75ml d'eau désionnisée pendant 3 heures. On laisse refroidir et on complète à 100ml avec de l'eau désionnisée.

Solution de carbonate de sodium à 15% dans de l'eau désionnisée: réactif B.

On pèse 50mg de l'échantillon contenant le proanthocyanidol à doser et on les dissout dans 10ml d'eau mesuré exactement.

On prélève 2ml de cette solution et on la dilue à 25ml dans une fiole jaugée, (solution C).

Dans une fiole jaugée de 50ml, on place:

Solution C: 5 ml

Réactif A: 1ml

Réactif B: q.s. 50ml.

On lit la densité optique (D.O.) à 715nm, 2 minutes exactement après le mélange du dernier réactif. On opère de même avec une gamme de quantités croissantes de pyrogallol (0 à 50mg) comme références et l'on mesure la densité optique obtenue avec chacune d'entre elles. La teneur en proanthocyanidol de l'échantillon étudié, est exprimé par référence à la quantité de pyrogallol (quantité mesurée) qui conduirait, dans les mêmes conditions d'analyse, à la même mesure de D.O. La détermination de cette quantité de pyrogallol se fait par référence aux résultats des mesures faites dans les conditions sus-indiquées avec les quantités croissantes de pyrogallol utilisées à titre de références.

2°/ -Dosage de la fonction tannante:

Une solution aqueuse de proanthocyanidol préparée comme la solution C ci-dessus. On effectue alors le dosage de la fonction polyphénolique comme indiqué ci-dessus. On agite ensuite 5ml de la solution pendant une heure à température ambiante avec 1g de poudre de

peau préchromée (Merck réf. 4332); puis la solution est filtrée sur papier.

On opère ensuite un dosage de la fonction polyphénolique totale sur le filtrat comme ci-dessus. La fonction tannante représente la différence entre la valeur trouvée pour les polyphénols totaux et la valeur trouvée sur le filtrat, séparé par la poudre de peau.

b/ Pour déterminer la fraction des proanthocyanidols dont le poids moléculaire apparent est supérieur à 2000, on pourra utiliser la méthode de détermination du poids moléculaire suivante:

On opère dans un premier temps une chromatographie haute performance d'exclusion sur gel  $\mu$ Bondagel 125 (Waters) dans un solvant aprotique, contre des témoins de polystyrène (Aldrich)

Débit: 0,5 ml/minute en isocratique.

Solvant: Chloroforme-diméthylsulfoxyde 50-50 (v/v)

Détection: D.O. à 283nm

Concentration des témoins: 1mg/ml dans le même solvant

Concentration du proanthocyanidol: 0,05mg/ml dans le même solvant

Poids moléculaires des témoins: 184.200, 50.000, 24.150, 7.025, 4.136 et 2.000.

Le témoin de 184.200 de poids moléculaire est utilisé comme témoin d'exclusion total sur le gel. En effet ce type de gel ne retient pas les poids moléculaires supérieurs à 50.000. On calcule ensuite le temps de rétention relatif de chaque échantillon par rapport au témoin totalement exclu.

On trace la courbe de correspondance entre les logarithmes décimaux des poids moléculaires des témoins et les temps relatifs de rétention correspondants. Le poids moléculaire des proanthocyanidols présents est apprécié par

comparaison du temps de rétention mesuré pour eux et des temps de rétention des témoins. Ces méthodes sont données uniquement à titre d'exemple.

D'autres méthodes permettant de déterminer la proportion de proanthocyanidols dans une composition donnée et conduisant également à donner la répartition en poids des proanthocyanidols présents, sont naturellement adaptées à la réalisation de l'invention.

L'invention vise également une composition à base de proanthocyanidols répondant aux définitions ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle est en outre essentiellement exempte:

- de protéines végétales,
- d'acide gallique et de tanins galliques,
- de flavonoïdes n'appartenant pas à la famille des flavanes-diols,
- de flavanes-diols oligomères,
- d'acides phénols.

Selon un premier mode de réalisation avantageux de l'invention, les compositions de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'au moins environ 95% en poids sec de proanthocyanidols.

Selon un autre aspect avantageux de l'invention, ces compositions à base de proanthocyanidols sont caractérisées en ce que les proanthocyanidols ont un poids moléculaire compris entre environ 2000  $\pm$  500 et environ 55000  $\pm$  5000.

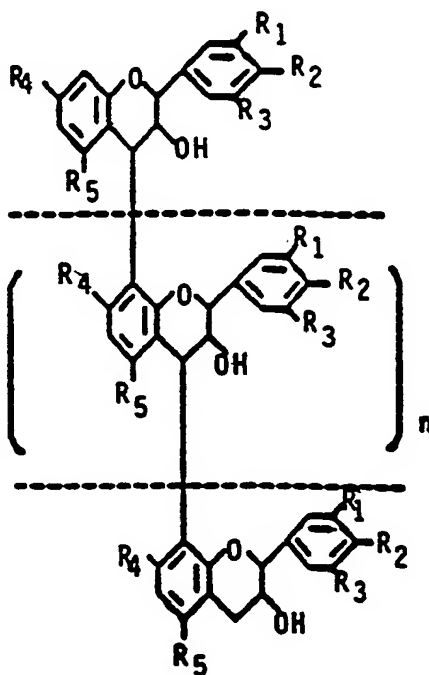
Une composition particulièrement intéressante comprend de préférence des proanthocyanodols de poids moléculaire d'environ 45000  $\pm$  5000.

D'autres compositions particulièrement intéressantes sont des compositions comprenant des proanthocyanidols ayant un poids moléculaire d'environ 5000  $\pm$  500, ou des compositions comprenant des

proanthocyanidols ayant un poids moléculaire d'environ  $3000 \pm 300$ .

La détermination de la pureté du proanthocyanidol polymère, dans un intervalle de poids moléculaire choisi, peut être effectuée en utilisant une chromatographie sur gel, à l'aide d'une membrane organique ayant un seuil de coupure déterminé, par exemple une membrane de polyéthersulfone ou de difluorure de polyvinylidène. Des détails concernant le protocole mis en oeuvre sont donnés dans les exemples.

Les compositions adaptées à la réalisation de l'invention sont selon une autre définition, caractérisées en ce qu'elles comprennent des proanthocyanidols sous forme de polymères, répondant à la formule suivante:



dans laquelle  $n$  est un entier supérieur ou égal à 3 et de préférence compris entre 3 et 350,



$R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  et  $R_5$  sont ensemble ou séparément, l'hydrogène, un groupement hydroxyle ou un groupement méthoxy, et de préférence en ce qu'il s'agit de polymères de procyanidols dans lequel  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_4$  et  $R_5$  sont des groupements hydroxyle et  $R_3$  est de l'hydrogène, ou de polymères de prodelphinidols dans lequel  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  et  $R_5$  sont des groupes hydroxyle ou en ce qu'il s'agit de polymères de promalvidols dans lequel  $R_1$  et  $R_3$  sont des groupes méthoxy et  $R_2$ ,  $R_4$  et  $R_5$  sont des groupements hydroxyle.

Les polymères de proanthocyanidols de l'invention peuvent être soit sous forme linéaire, ou encore organisés en réseaux. Les compositions de l'invention peuvent être formées d'un ou de plusieurs types de proanthocyanidols notamment lorsque ces compositions sont des extraits obtenus à partir d'une matière végétale, plusieurs types de polymères peuvent être présents dans la composition et leur répartition n'est pas nécessairement constante selon la matière végétale initiale utilisée.

D'une façon particulièrement intéressante, les compositions de l'invention comprennent des proanthocyanidols présentant une certaine solubilité dans l'eau, fonction du poids moléculaire et la nature de la molécule.

Lorsque ces compositions sont des extraits végétaux, elles peuvent être obtenues à partir de tout matériel végétal de plantes riches en proanthocyanidol de poids moléculaire supérieur à 2000 et susceptibles, au terme de la mise en oeuvre des procédés de dosage des fonctions polyphénoliques et tannantes, de donner des compositions ayant les caractéristiques ci-dessus définies.

Ainsi, à titre d'exemple d'espèces végétales utilisables comme source de proanthocyanidols, on cite

les conifères tels que *Cupressus sempervirens*, *Pinus maritima*, les zingibéracées telles que *Alpinia Galanga*, les plantes à procyanidols, à prodelphinidols, telles que *Vitis vinifera*, *Vaccinium myrtillus*, *Fragaria vesca* et des plantes à proanthocyanidols plus rares telles que les plantes à profisetinidols du genre *Schinopsis* et à proguibourtinidols extraits de divers *Acacia*.

On peut également citer des plantes de la famille des mimosacées.

L'invention vise naturellement, dans un mode de réalisation préféré, des compositions comprenant plusieurs types d'extraits végétaux satisfaisant aux définitions données.

L'invention concerne également un procédé pour la préparation d'une composition de proanthocyanidols, à partir d'une partie de plante contenant des proanthocyanidols de poids moléculaire supérieur à 2000, ce procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- décoction ou macération dans un alcool, notamment le méthanol ou l'éthanol, pour éliminer les polysaccharides notamment l'amidon,
- récupération des extraits hydroalcooliques et évaporation à sec, sous pression réduite, suivie éventuellement de lavage et récupération du résidu sec,
- reprise du résidu sec et filtration pour éliminer une partie de la fraction aromatique de l'extrait,
- extraction à contre-courant, à l'aide successivement d'au moins 3 solvants de polarité croissante, notamment l'éther éthylique, l'acétate d'éthyle, le butanol ou le méthanol notamment pour éliminer les essences aromatiques restantes, la plus grande partie possible des oligomères de PM inférieur à 2000 et des

monomères de proanthocyanidols et pour récupérer dans la phase alcoolique un extrait végétal contenant les proanthocyanidols, de poids moléculaire supérieur à 2000,

- le cas échéant, la purification de l'extrait obtenu pour éliminer les solvants restants.

L'étape de purification peut consister en une dyafiltration avec de l'eau désionnisée afin d'éliminer la plus grande partie du solvant. Cette opération est par exemple réalisée en réfrigérant le liquide en continu à basse température en particulier à 4°C.

Pour la conservation du produit, une fois le solvant éliminé une possibilité offerte consiste à concentrer le plus possible la solution-suspension aqueuse de proanthocyanidols polymères puis à la lyophiliser. La conservation peut également être réalisée sous forme d'un produit cristallisé à partir de la solution-suspension aqueuse.

L'extraction est de préférence menée de manière à éviter la dégradation des proanthocyanidols. Pour ce faire, il est préférable d'éviter de trop hautes températures et de réduire la quantité d'oxygène en contact avec les composés proanthocyanidoliques. Ainsi, l'extraction et les étapes ultérieures peuvent être réalisées sous atmosphère inerte, par exemple sous azote.

Pour éliminer les proanthocyanidols de poids moléculaire inférieur à 2000, on pourra mettre en oeuvre la méthode suivante: la fraction extraite au moyen des divers solvants utilisés est ultrafiltrée sur une membrane organique et notamment de type membrane de polyéther sulfone, ou une membrane de difluorure de polyvinylidène, dont le seuil de coupure est choisi en fonction de la fraction de

proanthocyanidol que l'on souhaite éliminer. En fin d'opération, on obtient une solution concentrée de polymères retenus sur la membrane, et une solution diluée de produits de poids moléculaire inférieur à celui du seuil de coupure.

Ces étapes peuvent être suivies éventuellement d'une étape de lavage jusqu'à obtention d'une teneur inférieure à 10%, avantageusement inférieure à 5%, et de préférence à 1% de produits légers, par rapport à la substance finale obtenue sèche.

Un autre procédé particulièrement avantageux pour la préparation des compositions de proanthocyanidols, à partir d'une partie de plante contenant des proanthocyanidols de poids moléculaire supérieur à 2000, comprend les étapes suivantes:

- décoction ou macération dans un alcool, notamment le méthanol ou l'éthanol, pour éliminer les polysaccharides, notamment l'amidon,
- ultrafiltration des solutions hydroalcooliques sur une membrane organique d'une porosité telle que son seuil de coupure serait de 20000 Daltons pour une protéine globulaire ultrafiltrée dans une solution aqueuse.
- récupération des extraits hydroalcooliques et évaporation à sec, sous pression réduite, suivie éventuellement de lavage et récupération du résidu sec.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le procédé décrit ci-dessus peut être mis en oeuvre à partir d'une matière végétale initiale constituée par des cônes de *Cupressus sempervirens*, ou à partir de rhizomes frais d'*Alpinia galanga*.

Les compositions de l'invention sont particulièrement intéressantes dans la mesure où elles sont dépourvues de cytotoxicité et partant peuvent

être utilisées dans des compositions pharmaceutiques. De plus, les inventeurs ont constaté la capacité des proanthocyanidols de ces compositions de se fixer sur les récepteurs cellulaires des virus. A cet égard, l'invention concerne des compositions pharmaceutiques comprenant une quantité efficace à titre de principes d'actifs, d'au moins une composition de proanthocyanidols telle que définie précédemment, en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable.

De telles compositions peuvent être utilisées selon différents modes d'administration.

A titre d'exemple on peut citer comme voies d'administration adaptées, la voie topique (dermique ou oculaire), la voie rectale, la voie orale.

De façon particulièrement avantageuse, elles seront appliquées sous forme topique, dans ce cas elles comprennent des excipients ou des adjuvants habituellement utilisés pour ce mode d'administration.

Ces compositions pharmaceutiques comprennent avantageusement entre environ 0,1% et environ 5% de principes actifs.

L'utilisation des proanthocyanidols de l'invention dans des compositions pharmaceutiques est intéressante pour les propriétés antivirales de ces molécules. De telles compositions sont particulièrement adaptées pour combattre des virus tels que celui de l'herpès type I, de l'herpès type II, de la varicelle-zona, de l'Influenza A, le virus Echo 25 et le virus HIV, le rotavirus, le cytomégalo virus et le virus de l'hépatite A.

Un autre intérêt des proanthocyanidols de l'invention dans des compositions pharmaceutiques, est qu'ils peuvent être utilisés en tant qu'antiprotéases, notamment en tant qu'antiélastases et anticol-

lagénases. Les inventeurs ont en effet montré qu'ils possèdent la propriété de protéger in vivo le tissu conjonctif contre les enzymes qui le dégrade de façon naturelle. Par conséquent, ils peuvent être utilisés comme agents antiemphysème, veinotonique et vasculoprotecteurs, comme agents de la lutte contre les effets du vieillissement du tissu conjonctif tel que celui du système cardiovasculaire, de la peau, des muqueuses, du pancréas, des gencives, etc...

Les proanthocyanidols de l'invention ont aussi la propriété de renforcer l'attachement de la matrice intercellulaire aux fibroblastes, de stimuler la fibrillogénèse du collagène et de stimuler la synthèse des protéines du parenchyme hépatique.

Un avantage des compositions de l'invention réside dans le fait qu'elles entraînent peu d'effets secondaires néfastes, et sont d'une toxicité très faible.

Une posologie adaptée à l'administration orale consiste à administrer de 0,01/kg/24heures de composition à 0,2/kg/24heures de composition et de préférence environ 0,1g/kg/24 heures.

L'invention vise également des compositions pharmaceutiques comprenant à titre de principe actif, des proanthocyanidols en association avec une ou plusieurs substance(s) choisie(s) parmi les antibiotiques, les antiseptiques, les antiinflammatoires et les antipyrétiques, dès lors que ces substances sont chimiquement compatibles avec les proanthocyanidols.

L'invention vise en outre l'utilisation des compositions de proanthocyanidols ci-dessus pour la fabrication d'un médicament à activité antivirale.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples donnés à titre non limitatif dans la suite. Dans ces exemples, le terme "procyanidol" est également utilisé pour désigner les proanthocyanidols.

#### Exemple 1

##### Extrait hydrométhanolique de cônes de Cupressus sempervirens

200g de cônes secs concassés de Cupressus sempervirens sont décoctés trois fois de suite pendant une demi-heure par 2000ml de méthanol à 80%. Les extraits hydrométhanoliques sont réunis et évaporés à sec sous pression réduite. On reprend ce résidu par 200ml d'eau distillée à 20°C environ. On filtre. On reprend l'insoluble par 200ml d'eau distillée à 20°C environ. On filtre. Les filtrats sont réunis. Le résidu de cette solution est d'environ 33g soit un rendement de 16,5%.

#### 1.2 - Fraction procyanidolique

La solution aqueuse, obtenue précédemment est ajustée à 400ml par de l'eau distillée et extraite à contre-courant par 5 fois 100ml d'éther éthylique. La phase étherée est éliminée, l'éther éthylique est chassé de la phase aqueuse par évaporation sous pression réduite. On complète le volume de la solution aqueuse à 400ml par de l'eau distillée, puis on extrait à contre-courant par 5 fois 100ml d'acétate d'éthyle.

La phase organique est éliminée. On chasse l'acétate d'éthyle de la solution aqueuse par évaporation sous pression réduite. On complète le volume de la solution à 400ml par de l'eau distillée, puis on l'extrait à contre-courant par 5 fois 100ml de n-butanol. La phase butanolique est lavée par 2 fois 100ml d'eau distillée puis évaporée à sec sous

pression réduite. Ce résidu est dissous dans 20ml de méthanol et la solution méthanolique est filtrée puis évaporée à sec. Le résidu est de 780mg soit un rendement de 0,39%. Le produit ainsi obtenu chromatographié sur plaque de gel de silice, révèle l'absence de substances susceptibles de migrer dans le solvant acétate d'éthyle, acide formique, eau (8-1-1 V/V), ce qui indique l'absence de substances de bas poids moléculaires ( $<10^3$ ). Cette technique permet de suivre la purification du produit. D'autre part, ce résidu dissous dans un alcool et traité à chaud par de l'acide chlorhydrique donne lieu à la formation d'une coloration rouge. Une chromatographie sur plaque contre un témoin révèle la formation de cyanidine, à l'exclusion d'autre anthocyane. La détermination du poids moléculaire de ce résidu en perméation de gel en milieu non aqueux révèle une répartition de poids moléculaires de 1000 à 5000 environ, avec la présence minoritaire de polymères de haut poids moléculaire ( $>5.10^3$ ).

#### Exemple 2

##### Extrait hydroéthanolique de rhizomes d'Alpinia galanga

##### 2.1 - Extrait brut soluble

1kg de rhizomes frais d'Alpinia galanga contenant 88% d'eau sont broyés puis soumis à une première décoction d'une demi-heure dans 9,2 litres d'éthanol à 65,8% afin de réaliser en fait une décoction de l'équivalent de 220g de rhizomes secs par 10 litres d'éthanol à 60%. Puis les rhizomes sont décoctés deux fois de suite par 10 litres d'éthanol à 60% pendant une demi-heure. Les extraits sont réunis et évaporés à sec sous pression réduite. On reprend ensuite ce résidu par 220ml d'eau distillée à 20°C environ et on filtre. L'insoluble est repris par 220ml d'eau distillée à 20°C. Les filtrats sont réunis. Le résidu



de cette solution aqueuse est de 38,4g soit un rendement de 3,84% par rapport aux rhizomes frais et de 17,45% par rapport aux rhizomes secs.

## 2.2 - Fraction procyanidolique

La solution aqueuse précédente est traitée de la même façon que dans le cas de l'exemple 1.2 jusqu'à l'évaporation de la phase butanolique. Le résidu est alors lavé à 20°C environ par deux fois 20ml d'eau distillée. Le résidu final est de 104mg soit un rendement de 0,01% par rapport aux rhizomes frais et de 0,4% par rapport aux rhizomes secs. Cette fraction présente les mêmes caractéristiques qualitatives que celles des cônes de *Cupressus sempervirens*. La mesure du poids moléculaire révèle un poids moyen de 4000.

### Exemple 3

#### Fraction procyanidolique insoluble de *Cupressus Sempervirens*

200g de cônes secs concassés de *Cupressus sempervirens* sont décoctés trois fois de suite pendant une demi-heure par 2000ml de méthanol à 80%. Les extraits hydrométhanoliques sont réunis et évaporés à sec sous pression réduite. On lave ce résidu par deux fois 200ml d'eau distillée à 20°C environ. Les eaux de lavage sont éliminées. Le résidu est séché sous vide au dessiccateur puis lavé à reflux par deux fois 200ml d'éther éthylique. La phase étherée est éliminée. Le résidu est ensuite lavé par deux fois 200ml d'acétate d'éthyle. La phase soluble dans l'acétate d'éthyle est éliminée. Puis le résidu est repris par 20ml de méthanol à 20°C environ. La solution méthanolique est filtrée. Le résidu de cette solution méthanolique est de 1,74g soit un rendement de 0,87%. Cette fraction insoluble dans l'eau présente les mêmes caractéristiques qualitatives que la fraction soluble obtenue à l'exemple 1. La détermination des poids

moléculaires indique la présence très prépondérante de molécules de hauts poids moléculaires ( $5.10^4$ ).

Une étape supplémentaire peut être ajoutée après la dyafiltration finale au méthanol à 80%: on opère une autre dyafiltration avec de l'eau désionnisée afin d'éliminer totalement ou presque le méthanol. Cette opération se fait en réfrigérant le liquide en continu à +4°C. Une fois que le méthanol est éliminé, on concentre le plus possible la solution-suspension aqueuse de procyanidol polymère et on la lyophilise.

On peut aussi réaliser à ce stade une cristallisation à partir de la solution-suspension aqueuse. Le procyanidol polymère cristallise en aiguilles de couleur acajou foncé.

#### Exemple 4

#### Préparation d'une fraction de poids moléculaire 45000 daltons de procyanidols de cônes de Cupressus sempervirens

20kg de cônes de Cupressus sempervirens sont macérés 3 jours trois fois de suite dans 300 litres de méthanol à 80% (20% d'eau en volume). Les solutions extractives sont réunies pour former environ 850 litres.

La solution est ultrafiltrée sur des membranes tubulaires en polyéthersulfone présentant un seuil de coupure de 50000 daltons, afin d'éliminer les polymères très hautement polymérisés supérieurs à environ  $5.10^4$ .

Le filtrat est ensuite ultrafiltré sur des membranes de même type mais présentant un seuil de coupure de 20000 daltons. Le produit retenu sur ces membranes est lavé par diafiltration jusqu'à ce que les poids moléculaires faibles ne représentent plus que 1% du poids global de substance sèche.

Exemple 5Préparation de proanthocyanidols de Cupressus sempervirens de poids moléculaire 3000

20 kg de cônes de Cupressus sempervirens sont mis à macérer trois fois successivement pendant 24 heures dans 300 litres de méthanol à 80 % à température ambiante.

Les filtrats sont réunis et ultrafiltrés sur une membrane en polyéthersulfone présentant un seuil de coupure de 5000 daltons vis-à-vis de protéines globulaires.

Le rétentat est ensuite dyafiltré par du méthanol à 80 % jusqu'à ce que le résidu sec du perméat soit inférieur à 0,1 %.

Le rétentat est ensuite ultrafiltré sur une membrane en polyéthersulfone présentant un seuil de coupure de 20000 vis-à-vis des protéines globulaires.

Ce dernier rétentat est dyafiltré par du méthanol à 80 % puis par du méthanol pur jusqu'à ce que le résidu sec du filtrat soit inférieur à 0,1 % et le titre de ce filtrat en méthanol supérieur à 97 %.

Le rétentat final est ensuite séché sous pression réduite à une température inférieure à 50°C. La quantité de proanthocyanidol obtenue est de 147g.

Exemple 6Méthodes de dosage et détermination de la pureté

Le dosage de procyanidols obtenus à partir de Cupressus sempervirens peut faire appel à leur structure polyphénolique et donc à leur propriété réductrice de l'acide phosphotungstique (peu spécifique) ou à leur nature de proanthocyanidol c'est-à-dire à leur propriété de donner une anthocyane par traitement à chaud par les acides forts.

Dans les deux cas on obtient une valeur relative à un témoin plus ou moins éloigné de la molécule elle-même.

On peut aussi faire appel à la propriété tannante des procyanidols en solution aqueuse: il s'agit dans ce cas de déterminer la fixation sur de la poudre de peau préchromée.

1°/ -Dosage de la fonction polyphénolique:

On chauffe à reflux 10g de tungstate de sodium avec 8ml d'acide orthophosphorique et 75ml d'eau désionnisée pendant 3 heures. On laisse refroidir et on complète à 100ml avec de l'eau désionnisée.

Solution de carbonate de sodium à 15% dans de l'eau désionnisée: réactif B.

On pèse 50mg de procyanidol et on les dissout dans 10ml d'eau mesuré exactement.

On prélève 2ml de cette solution et on la dilue à 25ml dans une fiole jaugée, (solution C).

Dans une fiole jaugée de 50ml, on place:

Solution C: 5 ml

Réactif A: 1ml

Réactif B: q.s. 50ml.

On lit la D.O. à 715nm, 2 minutes exactement après le mélange du dernier réactif. On opère de même avec une gamme de pyrogallol (0 à 50mg) comme référence.

Le résultat pour le procyanidol polymère est de 43,5% de polyphénols totaux exprimés en pyrogallol.

2°/ -Dosage de la fonction tannante:

Une solution de procyanidol préparée comme la solution C ci-dessus est agitée pendant une heure à température ambiante avec 1g de poudre de peau préchromée (Merck réf. 4332).

On opère ensuite un dosage de la fonction polyphénolique totale comme ci-dessus. La fonction

tannante représente la différence entre la valeur trouvée pour les polyphénols totaux et la valeur trouvée après le traitement par la poudre de peau.

Le résultat pour le procyanidol polymère, est de 80% exprimé en fonction tannante.

3°/ -Dosage de la fonction procyanidolique proprement dite:

10mg de procyanidol polymère mesurés environ exactement sont dissous dans 20ml d'éthanol à 75%.

On réalise un tube essai avec 1ml de cette solution, 5ml d'éthanol à 75% et 1ml d'acide chlorhydrique concentré. On place au bain marie bouillant pendant 30 minutes.

On réalise le tube témoin en mélangeant les mêmes constituants dans les mêmes proportions mais à la température ambiante et juste avant la lecture au spectrophotomètre.

On lit la D.O. de la solution essai à 540nm contre la solution témoin.

Le résultat pour le procyanidol polymère est de 0.60.

4°/ -Détermination du poids moléculaire du procyanidol polymère:

On opère une chromatographie haute performance d'exclusion sur gel  $\mu$ Bondagel 125 (Waters) dans un solvant aprotique contre des témoins de polystyrène (Aldrich)

Débit: 0,5 ml/minute en isocratique.

Solvant: Chloroforme-diméthylsulfoxyde 50-50 (v/v)

Détection: D.O. à 283nm

Concentration des témoins: 1mg/ml dans le même solvant

Concentration du proanthocyanidol: 0,05mg/ml dans le même solvant.

Poids moléculaires des témoins: 184.200, 50.000, 24.150, 7.025, 4.136 et 2.000.

Le témoin de 184.200 de poids moléculaire est utilisé comme témoin d'exclusion total sur le gel. En effet ce type de gel ne retient pas les poids moléculaires supérieurs à 50.000. On calcule ensuite le temps de rétention relatif de chaque échantillon par rapport au témoin totalement exclu.

On trace la courbe de correspondance entre le logarithme décimal du poids moléculaire et le temps relatif de rétention.

Le résultat pour le procyanidol polymère obtenu en appliquant la technique décrite précédemment est de 45.000.

5/ -Détermination de la pureté du procyanidol polymère par chromatographie sur gel:

La technique de chromatographie ci-dessus procure un tracé qui comprend deux pic. L'un correspond aux impuretés de poids moléculaire inférieurs à 5000. En effet par cette technique de chromatographie on constate que les poids moléculaires inférieurs à 5000 sont rassemblés en un seul pic à la fin du chromatogramme.

La méthode de préparation qui fait intervenir une ultrafiltration finale sur une membrane au seuil de coupure de 20.000 environ permet d'obtenir à la fin de l'opération une solution concentrée de polymère retenu sur la membrane et une solution diluée de produits de poids moléculaires inférieurs à 20.000 et qui ne contient pas de procyanidol (vérifié par la méthode du 3°).

On détermine alors la concentration en matière sèche totale des deux solutions. Puis on détermine leur absorption en U.V. à 283nm. On peut ainsi calculer le  $E_{1\%}^{1cm}$ : Capacité d'absorption de la lumière du produit en solution à 1% sur 1cm de trajet optique de chaque produit.

On calcule alors sur le chromatogramme le rapport des aires des deux pics et on en conclut la pureté du procyanidol polymère.

Le résultat obtenu par cette méthode est de 98%.

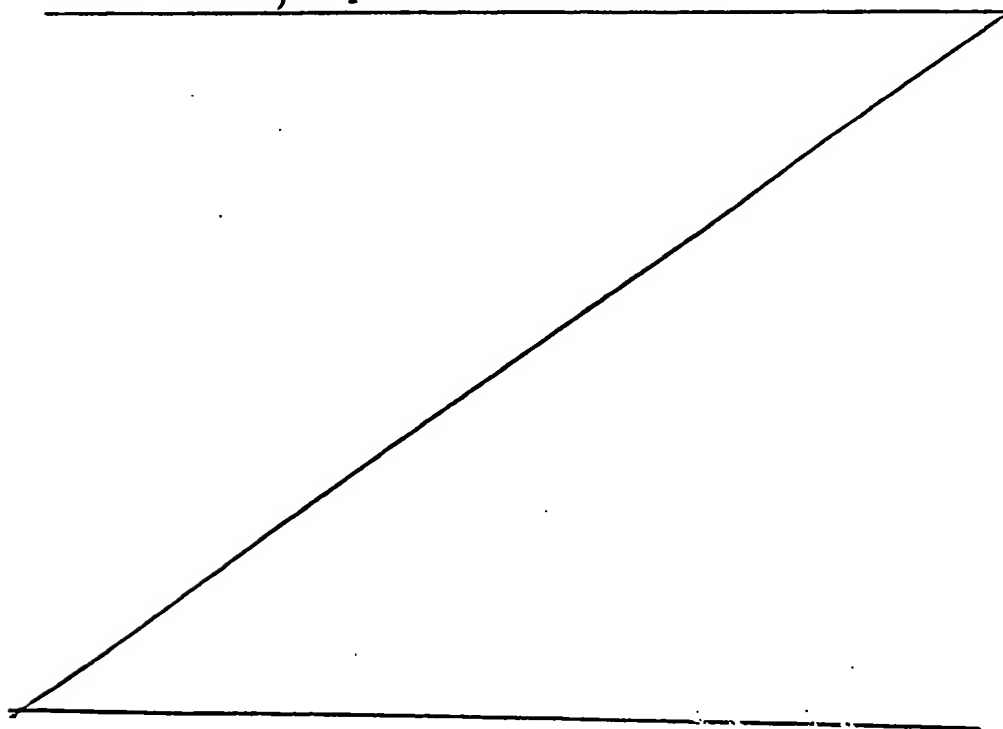
#### Exemple 7

##### Essais antiviraux in vitro

Les essais antiviraux ont été réalisés sur le virus de l'herpès simplex de type I (HVS 1) implanté sur des fibroblastes de poumon embryonnaire humain.

On a déterminé sur un même lot de dilution virale correspondant à une dose infectante  $50(DI\ 50)10^{5,7}$  virus par puits, l'efficacité antivirale des différents produits proanthocyanidoliques obtenus, c'est-à-dire la quantité de produit par puits, c'est-à-dire  $100\mu l$  de milieu qui provoque une diminution de moitié de la DI 50.

A titre de comparaison, a été testée également la procyanidine A2, dimère procyanidolique extrait du marron d'Inde, de poids moléculaire 546.



EXTRAIT	QUANTITE PROVOQUANT LA DIMINUTION DE MOITIE DE LA DI 50
Procyanidols solubles de Cupressus sempervirens	40 µg/ml
Procyanidols insolubles de Cupressus sempervirens	72 µg/ml
Procyanidols solubles d'Alpinia galanga	10 µg/ml
Procyanidine A2	156 µg/ml

Un autre essai sur le virus HVS 1 a été réalisé avec une composition de proanthocyanidols de poids moléculaire 3000 telle que préparée dans l'exemple 5, dans les conditions suivantes :

- une suspension de cellules diploïdes humaines fibroblastiques (MRC5 Biomérieux) est diluée au 1/15 par du milieu MEM (Gibco, ref. 041-02565) supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal, 1 % de solution de vitamines (Gibco, ref. 043-01120), 1 % de solution de glutamine 200 mM, 1 % de solution d'antibiotiques (pénicilline à 200 U/ml, streptomycine à 50 µg/ml, amphotéricine B à 2 µg/ml). Cette suspension est implantée à raison de 100µl par puits sur des plaques de 96 puits. On incube 48 heures à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.
- On réalise une solution mère à 0,5 % de proanthocyanidols correspondant à la définition ci-dessus. On prépare ensuite des dilutions successives



de raison 2 jusqu'au 1/512 de cette solution mère dans le même milieu que ci-dessus mais contenant 2 % de sérum de veau foetal. On élimine les dilutions inférieures au 1/16.

- La suspension de HSV 1, typée, congelée et titrée est diluée de 10 en 10 jusqu'à  $10^{-7}$  dans le milieu ci-dessus mais ne contenant que 2 % de sérum de veau foetal. On répartit dans différents tubes 1 ml de chaque dilution auquel on ajoute pour les essais 1 ml de chaque dilution de proanthocyanidols, et pour les témoins 1 ml de milieu contenant 2 % de sérum de veau foetal. On laisse en contact 1 heure à 37°C.

- On élimine le surnageant des puits où sont cultivées les cellules et on place dans chaque puits 200 µl de chaque dilution.

- On laisse incuber 1 heure à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub>. On rince deux fois par 200 µl de milieu avec 2 % de sérum de veau foetal puis on ajoute 200 µl du même milieu et on laisse incuber 5 jours dans les mêmes conditions atmosphériques.

- On lit ensuite les effets cytopathogènes dans chaque puits de manière directe.

On a observé que la réduction de 50 % du titre viral est obtenue pour une concentration d'environ 25 µg/ml.

#### Exemple 8

Essai des procyanidols de Cupressus sempervirens solubles dans l'eau sur le virus du syndrome immunodéficitaire acquis humain (HIV-1).

##### a/ Effet antiviral

L'essai est réalisé sur des cellules H9 infectées par des dilutions décimales successives de HIV-1 pendant 90 minutes.

Après infection des cellules, celles-ci sont traitées par des concentrations décroissantes de

procyanidols à des doses inférieures à la cytotoxicité constatée sur cette lignée cellulaire (150µg/ml).

Après 10 jours de culture, les cellules sont centrifugées et les virus sont recherchés par un examen radio-immunologique (recherche de la protéine p24) sur le surnageant.

Résultats:

Les procyanidols solubles du cyprès obtenus selon l'exemple 1 procurent une inhibition de l'expression virale de 97% à la concentration de 50µg/ml.

b/ Effet virucide

La suspension virale (HIV1) est traitée pendant 30 minutes à 37°C par des concentrations décroissantes de procyanidols solubles du cyprès. Puis les cellules H9 sont infectées par des dilutions décimales successives de la suspension précédente.

Résultats:

Les procyanidols solubles du cyprès procurent une réduction du titre viral de 1,5 log (titre initial:  $3 \cdot 10^4$ ) à la concentration de 50µg/ml, et une réduction de 2,5 log à la concentration de 150µg/ml.

Exemple 9

Essai des procyanidols solubles dans l'eau de Cupressus sempervirens sur le virus de l'herpès Simplex de type II.

Les essais antiviraux ont été réalisés sur le virus de l'herpès simplex type II implanté sur des fibroblastes de poumon embryonnaire humain.

On a déterminé sur un lot de suspension virale correspondant à une dose infectante  $50(DI\ 50)2,5 \cdot 10^4$  virus par puits, l'efficacité antivirale des procyanidols solubles de Cupressus sempervirens, c'est-à-dire la quantité de produit par puits (c'est-à-dire dans 100µl de milieu) qui provoque une diminution de moitié de la  $DI_{50}$ .

La valeur trouvée est de  $3,3\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ .

#### Exemple 10

##### Essai des procyanidols solubles dans l'eau de Cupressus sempervirens sur le virus Varicelle-Zona

Les essais antiviraux ont été réalisés sur le virus de la varicelle et du zona implanté sur des fibroblastes de poumon embryonnaire humain.

On a déterminé un lot de suspension virale correspondant à une dose infectante 50 (DI50)  $5.10^3$  virus par puits, l'efficacité anti-virale des procyanidols solubles de Cupressus sempervirens, c'est-à-dire la quantité de produit par puits (c'est-à-dire  $100\mu\text{l}$  de milieu) qui provoque une diminution de moitié de la DI50.

La valeur trouvée est de  $6\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ .

Un deuxième test, réalisé avec une composition de proanthocyanidols de poids moléculaire 3000 a montré que le pouvoir virucide de cette composition est de 100 % pour un titre viral de départ de  $3.10^3$ , et pour une concentration de  $312,5\mu\text{g}/\text{ml}$  dans les conditions opératoires détaillées données pour le deuxième test décrit pour le virus HVS 1 dans l'exemple 5.

#### Exemple 11

##### Essai des procyanidols solubles dans l'eau de Cupressus sempervirens sur le virus Influenza A

Les essais antiviraux ont été réalisés sur le virus Influenza A implanté sur des cellules d'adénocarcinome de colon humain.

On a déterminé sur un lot de suspension virale correspondant à une dose infectante 50 (DI50)  $7.10^3$  virus par puits, l'efficacité antivirale des procyanidols solubles de Cupressus sempervirens, c'est-à-dire la quantité de produit par puits (c'est-à-dire dans  $100\mu\text{l}$  de milieu) qui provoque une diminution de moitié de la DI50.

La valeur trouvée est de  $12\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ .

Un deuxième test est réalisé dans les conditions suivantes :

- Une suspension de cellules d'adénocarcinome de colon humain (HT 29 Bimérieux) est diluée au 1/15 par du milieu MEM (Gibco, ref. 041-02565) supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal, 1 % de solution de vitamines (Gibco, ref. 043-01120), 1 % de glutamine 200 mM, 1 % de solution d'acides aminés non essentiels (Gibco, ref. 043-01140), 0,1 % de solution de transférine humaine à 1 mg/100 ml, 1 % de solution d'antibiotiques (pénicilline à 200 U/ml, streptomycine à 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , amphotéricine B à 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Cette suspension est implantée à raison de 100  $\mu\text{l}$  par puits sur des plaques de 96 puits. On incube 48 heures à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de  $\text{CO}_2$ .

- On réalise une solution mère à 0,5 % de proanthocyanidols de composition de poids moléculaire 3000. On prépare ensuite des dilutions successives de raison 2 jusqu'au 1/16 de cette solution mère dans le même milieu que ci-dessus mais contenant 2 % de sérum de veau foetal.

- La suspension de virus influenza A, typée, congelée et titrée est diluée de 10 en 10 jusqu'à  $10^{-7}$  dans le milieu ci-dessus mais ne contenant que 2 % de sérum de veau foetal. On répartit dans différents tubes 1 ml de chaque dilution auquel on ajoute pour les essais 1 ml de la dilution de proanthocyanidols, et pour les témoins 1 ml de milieu contenant 2 % de sérum de veau foetal. On laisse en contact 1 heure à 37°C. On élimine le surnageant des puits où sont cultivées les cellules et on place dans chaque puits 200  $\mu\text{l}$  de chaque dilution.

- On laisse incuber 1 heure à 37°C et 5 % de  $\text{CO}_2$ . On rince deux fois par 200  $\mu\text{l}$  de milieu avec 2 % de sérum

27

de veau foetal, puis on ajoute 200  $\mu$ l du même milieu et on laisse incuber 24 heures dans les mêmes conditions atmosphériques.

- La lecture des résultats se fait par une technique d'immunofluorescence.

- On congèle la plaque à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant au moins 1/2 heure après avoir éliminé le milieu et on fixe les cellules par 100  $\mu$ l d'éthanol à 96 %. On rince trois fois avec 100  $\mu$ l de tampon PBS et on ajoute 100  $\mu$ l de sérum antigrippe A de lapin dilué au 1/100 dans du tampon PBS. On laisse incuber 30 à 40 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$ . On rince trois fois 100  $\mu$ l de tampon PBS et on ajoute ensuite 100  $\mu$ l d'une solution au 1/100 d'anticorps de lapin marqués à la fluoresceine anti IgG (H + L).

- On laisse agir 45 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$ , on rince par trois fois 100  $\mu$ l de tampon PBS. On compte ensuite le nombre de cellules fluorescentes par puits.

Dans ces conditions, le pouvoir virucide des proanthocyanidols utilisés, est de 85 %, pour un titre viral de départ de  $5.10^3$ , et pour une concentration de 312,5  $\mu$ /ml.

#### Exemple 12

#### Essai des procyanidols solubles dans l'eau de Cupressus sempervirens sur le virus ECHO 25

Les essais antiviraux ont été réalisés sur le virus ECHO 25 implanté sur des fibroblastes de poumon embryonnaire humain.

On a déterminé sur un lot de suspension virale correspondant à une dose infectante 50 (DI50)  $10^4$  virus par puits, l'efficacité antivirale des procyanidols solubles de Cupressus sempervirens, c'est-à-dire la quantité de produit par puits (c'est-à-dire dans 100  $\mu$ l de milieu) qui provoque une diminution de moitié de la DI50.

La valeur trouvée est de 312  $\mu$ g/100  $\mu$ l.

Exemple 13Effet d'une composition de proanthocyanidols sur le cytomégalo virus.

Une suspension de cellules diploïdes humaines fibroblastiques (MRC5 Biomérieux) est diluée au 1/15 par du milieu MEM (Gibco, ref. 041-02565), supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal, 1 % de solution de vitamines (Gibco, ref. 043-01120), 1 % de solution de glutamine 200 mM, 1 % de solution d'antibiotiques (pénicilline à 200 U/ml, streptomycine à 50 µg/ml, amphotéricine B à 2 µg/ml). Cette suspension est implantée à raison de 100 µl par puits sur ces plaques de 96 puits. On incube 48 heures à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

On réalise une solution mère à 0,5 % de proanthocyanidols de poids moléculaire 3000. On prépare ensuite des dilutions successives de raison 2 jusqu'au 1/16 de cette solution mère dans le même milieu que ci-dessus mais contenant 2 % de sérum de veau foetal.

La suspension de CMV, typée, congelée et titrée est diluée au 1/10 puis de 2 en 2 jusqu'à 10<sup>-2</sup> dans le milieu ci-dessus mais ne contenant que 2 % de sérum de veau foetal. On répartit dans différents tubes 1 ml de chaque dilution auquel on ajoute pour les essais 1 ml de chaque dilution de proanthocyanidols ayant la composition ci-dessus, et pour les témoins 1 ml de milieu contenant 2 % de sérum de veau foetal. On laisse en contact 1 heure à 37°C.

On élimine le surnageant des puits où sont cultivées les cellules et on place dans chaque puits 200 µl de chaque dilution.

On laisse incubé 2 heures à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub>. On rince deux fois par 200 µl de milieu avec 2 % de sérum de veau foetal, puis on ajoute 200 µl de même

milieu et on laisse incuber 12 heures dans les mêmes conditions atmosphériques.

On lit ensuite les effet cytophatogènes dans chaque puits par une technique ELISA.

Dans ces conditions, le pouvoir virucide des proanthocyanidols utilisés est de 100 % pour titre viral de départ de  $5,65.10^2$  et pour une concentration de 312,5  $\mu$ /ml.

#### Exemple 14

##### Activité de la fraction procyanidolique de poids moléculaire 45000 sur les Rotavirus

Les essais antiviraux ont été réalisés sur une souche sauvage de rotavirus implantée sur des cellules de reins embryonnaires de singes rhésus MA104.

On a déterminé sur un lot de suspension virale correspondant à une dose infectante 50 (DI50)  $2.10^3$  virus par puits, l'efficacité antivirale de cette fraction procyanidolique, c'est-à-dire la quantité du produit par puits (c'est-à-dire dans 100 $\mu$ l de milieu) qui provoque une diminution de moitié de la DI50. La valeur trouvée est de 8 $\mu$ g/100 $\mu$ l.

#### Exemple 15

##### Essai de proanthocyanidols de poids moléculaire 3000 sur le virus de l'hépatite A

Le virus de l'hépatite A est cultivé sur des hépatomes maintenus en survie à 32°C. Les procyanidols sont dissous directement dans le milieu de culture.

On constate que la production antigénique est inhibée de 20 % pour une concentration en procyanidols de 5  $\mu$ g/ml, de 34 % pour une concentration de 10  $\mu$ g/ml et de 96 % pour une concentration de 20  $\mu$ g/ml.

#### Exemple 16

##### Effet de proanthocyanidols de poids moléculaires 3000 sur l'action d'une collagénase

On prépare un gel d'agarose mélangé à du collagène acido-soluble de peau de bovin.

Ce gel est coulé dans des boîtes de Pétri. Dans des puits creusés à l'emporte pièce dans le gel, on dépose des concentrations croissantes d'une solution de collagénase. L'enzyme diffuse autour du puits et dégrade le collagène en fonction de la concentration de l'enzyme.

Après coloration des boîtes au rouge Sirius, on distingue en jaune clair des zones de collagénolyse sur un fond rouge de collagène non dégradé. Le diamètre des plages de lyse est proportionnel à la concentration d'enzyme déposée dans un puits donné. On incube d'abord le collagène avec une solution de proanthocyanidol préparée comme ci-dessus, à des concentrations allant de 1 % à 5 %, et l'on prépare des boîtes de Pétri comme pour les témoins. On constate alors que les plages de lyse ont diminué de façon significative.

#### Exemple 17

#### Effets de proanthocyanidols de poids moléculaire 3000 sur l'action d'une élastase

Les proanthocyanidols sont préparés comme dans l'exemple 5.

On opère également pour le test comme pour l'exemple 16, mais en remplaçant le collagène par de l'élastine fibreuse micronisée et la collagénase par de l'élastase.

L'élastine fibreuse rend le gel opaque et une coloration n'est pas nécessaire.

On constate que lorsqu'une boîte est préparée avec de l'élastine préalablement incubée avec les proanthocyanidols, les plages de lyses sont réduites de façon significative.



Exemple 18Effet de proanthocyanidols de poids moléculaire 3000 sur une collagénase appliquée "ex vivo"

Les procyanidols sont préparés comme pour l'exemple 5.

On colore le collagène d'une coupe de peau humaine par le picro-indigocarmin. Les coupes témoins montrent que le collagène est dans un état normal.

On expose certaines de ces coupes à l'action d'une collagénase et l'on observe ensuite la dégradation partielle du collagène.

D'autres lames sont préalablement incubées avec les procyanidols et ensuite soumises à l'action de la collagénase. On constate une réduction nette de la dégradation du collagène dans ces coupes par rapport aux coupes témoins.

Exemple 19Effet de proanthocyanidols de poids moléculaire 3000 sur une élastase appliquée "ex vivo"

On opère comme pour l'exemple 18, mais l'on colore l'élastine avec la fuschine-(+)catéchine, et l'enzyme utilisée est ici une élastase. On constate comme pour l'exemple 18, une réduction de l'attaque de l'enzyme sur son substrat.

Exemple 20Stimulation de la fibrillogénèse du collagène par des proanthocyanidols de poids moléculaire 3000

Les procyanidols sont préparés comme dans l'exemple 19.

Du collagène acido-soluble de peau bovine est mélangé à du gel d'agarose. Ce collagène contient surtout des molécules isolées qui ont une faible tendance à l'agrégation. Cette agrégation peut être observée après coloration du collagène au rouge Sirius

au microscope optique, et quantifiée par analyse d'image.

On incube préalablement le collagène avec les procyanidols et l'on constate alors la formation d'agrégats de taille nettement plus grande. La surface occupée par ces agrégats est significativement plus grande que celle des témoins.

Afin de vérifier que ces agrégats ne sont pas de simples précipités amorphes, on examine les agrégats formés au microscope électronique. On constate alors que le collagène traité présente des formations de fibres régulières et portant la striation caractéristique du type interstitiel.

#### Exemple 21

#### Stimulation de l'attachement des fibres élastiques aux fibroblastes par des proanthocyanidols polymères de poids moléculaire 3000.

Les procyanidols sont préparés comme dans l'exemple 19.

Des fibroblastes de peau humaine sont cultivés sur milieu DMEM additionné de 10 % de sérum de veau foetal, et de procyanidols aux concentrations 1-0,1-0,01-0,001 mg/ml.

Une culture ne reçoit pas de produit et est utilisée comme témoin.

On ajoute aux cultures à confluence de l'élastine fibreuse micronisée à la concentration de 0,2 mg/ml et on laisse incuber 48 heures dans les conditions de la culture.

A la fin de l'incubation, les cellules sont rincées et l'élastine colorée selon la méthode de Verhoeff modifiée par Godeau ("Selective staining technique for the identification of human skin elastic fiber" Pathol. Biol., (1984), 32, p.215-216).

On évalue alors quantitativement l'élastine fixée aux cellules par analyse d'image :

Concentration en procyanidols	Aire de l'élastine fixées
0 mg/ml	3114 $\mu^2$
0,001 mg/ml	5059 $\mu^2$
0,01 mg/ml	5789 $\mu^2$
0,1 mg/ml	5227 $\mu^2$
1 mg/ml	3484 $\mu^2$

On constate que la présence de procyanidols dans les milieux de culture des fibroblastes confluents augmente la quantité d'élastine attachée aux cellules. La concentration optimale est de 0,01 mg/ml.

#### Exemple 22

#### Effet des procyanidols de poids moléculaire 3000 sur la perméabilité vasculaire centrale et périphérique

Les essais ont été réalisés sur 4 lots de 5 rats blancs Wistar d'un poids moyen initial de 250 à 300 g chacun.

Le principe du test consiste à augmenter artificiellement par administration intraveineuse de collagénase, la perméabilité vasculaire à la fois dans les grands troncs et dans les capillaires et à noter l'effet protecteur du produit administré quotidiennement par voie orale pendant trois semaines. Cette administration de protéase reproduit un mécanisme pathologique observé dans les états inflammatoires, dans le diabète, dans l'athérosclérose et aussi dans le vieillissement. Cet état peut aussi être observé dans des cas d'infection virale lors de la lyse du tissu conjonctif à la suite de la destruction cellulaire opérée par le virus.

**Lot 1 : Témoins négatifs :** ces rats reçoivent à la place du traitement du sérum physiologique par

## 34

voie orale et à la fin du traitement, une injection intraveineuse de sérum physiologique et une demi-heure après, une injection intraveineuse de traceur de perméabilité (peroxydase du raifort de type VI Sigma à raison de 100 mg/kg.

**Lot 2 : Témoins positifs :** ces rats reçoivent également du sérum physiologique par voie orale à la place du traitement mais à la fin de celui-ci, ils reçoivent de la collagénase par voie intraveineuse (270 unité de collagénase bactérienne) puis 30 minutes après le traceur de perméabilité. Les résultats de ce lot comparés à ceux du lot 1 permettent d'évaluer l'effet perméabilisant de la protéase administrée.

**Lot 3 : Effet du produit sans collagénase :** les rats reçoivent une administration per orale quotidienne pendant 21 jours de procyanidols à la dose de 50 mg/kg dans du sérum physiologique. A la fin du traitement, ils reçoivent une injection intraveineuse de sérum physiologique et 30 minutes après le traceur de perméabilité par la même voie. Les résultats de ce lot doivent montrer si le produit induit ou non une altération de la perméabilité vasculaire.

**Lot 4 : Lot expérimental proprement dit :** les rats reçoivent les 21 administrations de procyanidols comme le lot 3. Mais à la fin du traitement, ils reçoivent une injection de collagénase, puis 30 minutes après le traceur de perméabilité. Les résultats de ce lot comparés à ceux du lot 2 montrent si le

traitement a réduit ou non, l'effet perméabilisant de la collagénase.

Tous les rats sont ensuite sacrifiés et des coupes histologiques de certains de leurs tissus sont réalisées.

On constate qu'aucune altération de la perméabilité vasculaire normale n'intervient sous l'effet du traitement des rats pendant un mois avec le produit étudié.

Il ressort de cette étude, que les procyanidols exercent une action très nette sur les parois des gros vaisseaux et aussi sur les petits vaisseaux et les capillaires du cerveau (barrière hémato-encéphalique).

Au niveau de l'aorte la neutralisation des effets de la collagénase a été considérable mais il est encore plus intense au niveau de la veine cave et du lobe frontal du cerveau. Dans ces deux organes, les conditions de perméabilité ont été maintenues à la normale malgré l'injection de collagénase.

#### Exemple 23

#### Effet des procyanidols de poids moléculaire 3000 sur le lathyrisme expérimental de la souris

Lors de certaines pathologies le tissu conjonctif subit des lésions et des modifications de structure. Dans le but d'observer l'action des proanthocyanidols de poids moléculaire 3000 sur le tissu conjonctif, nous avons traité des souris avec un agent connu pour induire un lathyrisme expérimental : le  $\beta$ -aminopropionitrile (BAPN).

Les souris sont réparties en trois lots :

Lot 1 : lot témoin négatif : ces souris reçoivent quotidiennement 100ml/kg de sérum physiologique par voie intrapéritonéale pendant 11 semaines.

**Lot 2 : Lot témoin positif :** ces souris reçoivent quotidiennement pendant 11 semaines, 1000 mg/kg de  $\beta$ -aminopropionitrile (BAPN), produit connu pour induire un lathyrisme, dissous à raison de 100 mg/ml dans du sérum physiologique à raison de 100 mg/ml pour le BAPN et de 5 mg/ml pour les procyanidols.

**Lot 3 : Lot expérimental :** les souris reçoivent quotidiennement pendant 11 semaines 1000 mg/kg de BAPN et 50 mg/kg de procyanidols comme dans l'exemple 18. Les deux produits sont dissous dans du sérum physiologique à raison de 100 mg/ml pour le BAPN et de 5 mg/ml pour les procyanidols.

A la fin du traitement, les souris sont sacrifiées et l'on prélève la peau de l'aorte.

Les organes sont ensuite fixés pour examen histologique.

On constate au niveau de l'aorte, une désorganisation profonde des lames élastiques dans le lot 2 par rapport au lot 1. Le lot 3 apparaît tout à fait similaire au lot 1 et l'on observe donc l'effet protecteur des proanthocyanidols vis-à-vis du lathyrisme induit par le BAPN.

Au niveau de la peau, on observe que le lot 2 présente des trousseaux de collagène positionnés de manière anarchique ce qui n'est pas le cas du lot 1. Le lot 3 présente une meilleur organisation des trousseaux de collagène.

#### Exemple 24

#### Stimulation de la synthèse des protéines d'hépatomes par des proanthocyanidols de poids moléculaires 3000

Les procyanidols sont préparés comme dans l'exemple 19.

Le milieu de culture d'hépatomes maintenus en survie à 32°C est additionné de quantités croissantes de procyanidols. On mesure l'influence de la concentration de ce produit sur la synthèse des protéines de cette lignée cellulaire continue.

On constate que 10 µg/ml de procyanidols augmente la synthèse protéique de 130 %, 40 µg/ml l'augmente de 180 % et 160 µg/ml de 250 %.

#### Exemple 25

##### Essais de toxicité sur l'animal des proanthocyanidols obtenus dans les exemples précédents

La toxicité par voie orale de tous les proanthocyanidols obtenus, recherchée chez la souris n'a pu être évaluée, les doses à ingérer dépassant les possibilités des animaux et étant supérieures à 2g par kg de poids corporel.

Les tests d'irritation primaire cutanée des mêmes produits ainsi que les tests d'irritation oculaire pratiqués chez le lapin en solution aqueuse à 5% pour les fractions solubles ont permis de définir les produits comme non irritants. Les tests d'irritation primaire cutanée des proanthocyanidols insolubles en solution à 5% dans un mélange à 50% de monopropylèneglycol et d'eau ont permis de définir ces produits comme non irritants comparativement à un mélange pur de monopropylèneglycol et d'eau à 50%.

#### Exemple 26

##### Essais cliniques sur les procyanidols d'Alpinia galanga

Les essais cliniques ont été réalisés sur les proanthocyanidols d'Alpinia galanga obtenus à l'exemple 2.

L'étude a porté sur 140 malades, présentant des symptômes herpétiques débutant depuis moins de 24 heures, répartis comme suit:

.24 femmes d'âges compris entre 17 et 47 ans présentant un herpès récurrent lié au cycle menstruel. Parmi elles, on comptait 18 cas d'herpès labial et 6 cas d'herpès touchant des régions diverses du corps non muqueuses (ailes du nez, fesses, joues).

116 hommes d'âges compris entre 19 et 54 ans présentant tous un herpès labial.

Les femmes ont été réparties en quatre groupes:

- . un groupe témoin d'herpès labial récurrent,
- . un groupe essai de la même affection soit à chaque fois 9 personnes,
- . un groupe témoin d'herpès divers,
- . un groupe essai d'herpès divers, soit à chaque fois 3 personnes.

Les hommes ont été répartis en deux groupes égaux de 58 personnes, un groupe essai et un groupe témoin aussi homogène que possible.

Les témoins sont traités jusqu'à disparition des lésions à raison d'une application à 7h, 9h, 11h, 13h, 15h, 17h et 19h pendant trois jours puis d'une application matin, midi et soir jusqu'à la fin, d'un gel placebo de composition suivante:

Polyacrylate de sodium réticulé: 0,75%

Caramel: qs pour coloration

Conservateurs: paraoxybenzoate de propyle et de méthyle: 0,35%.

Eau distillée: qs 100%.

Les groupes essais sont traités dans les mêmes conditions que les témoins avec un gel de la composition suivante:

Polyacrylate de sodium réticulé: 0,75%

Fraction de proanthocyanidols: 2%

Conservateurs: paraoxybenzoate de propyle et de méthyle: 0,35%.

Eau distillée: qs 100%.



Résultats

On apprécie le temps que met la lésion à disparaître complètement ne laissant plus qu'une trace cicatricielle totalement fermée et sèche.

Groupe témoin des hommes: 5ème jour: 1

6ème jour: 4 et 1 abandon

7ème jour: 4

8ème jour: 16 et 2 abandons

9ème jour: 11

10ème jour: 14

11ème jour: 2

12ème jour: 3

Groupe essai des hommes: 1er jour: 1

2ème jour: 5

3ème jour: 37

4ème jour: 12

5ème jour: 1

6ème jour: 0

7ème jour: 1 abandon

8ème jour: 1

Premier groupe témoin des femmes:

5ème jour: 1

6ème jour: 1

7ème jour: 4

8ème jour: 0

9ème jour: 2 abandons

10ème au 15ème jour: 0

16ème jour: 1

Premier groupe essai des femmes:

1er jour: 4

2ème jour: 2

3ème jour: 2

4ème jour: 1

Deuxième groupe témoin des femmes:

13ème jour: 2

40

17ème jour: 1

Deuxième groupe essai des femmes:

4ème jour: 3

Outre une efficacité importante du produit, on note chez tous les sujets traités une excellente tolérance au traitement, aucun effet secondaire n'ayant été signalé, les abandons en cours d'essai ne sont pas liés à une intolérance au produit.

REVENDEICATIONS

1/ Composition à base de proanthocyanidols, notamment d'origine végétale, caractérisée par une proportion pondérale d'au moins 50% de molécules ayant des poids moléculaires apparents supérieurs à 2000, cette proportion étant constituée d'au moins 40% de proanthocyanidols, ce pourcentage étant exprimé en fonction tannante, et en ce que ladite composition est essentiellement exempte:

- d'essences aromatiques et notamment d'huiles essentielles, de résines et autres substances lipophiles
- de sucres polymérisés tels que l'amidon, les gommes, les dérivés cellulosiques,
- de sucres oligomères tels que le saccharose, le glucose, le levulose.

2/ Composition à base de proanthocyanidols selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement exempte:

- de protéines végétales,
- d'acide gallique et de tanins galliques,
- de flavonoïdes n'appartenant pas à la famille des flavanes-diols,
- de flavanes-diols oligomères,
- d'acides phénols.

3/ Composition selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'au moins 95% en poids sec de proanthocyanidols.

4/ Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les proanthocyanidols ont un poids moléculaire compris entre environ 2000  $\pm$  500 et environ 55000  $\pm$  5000.

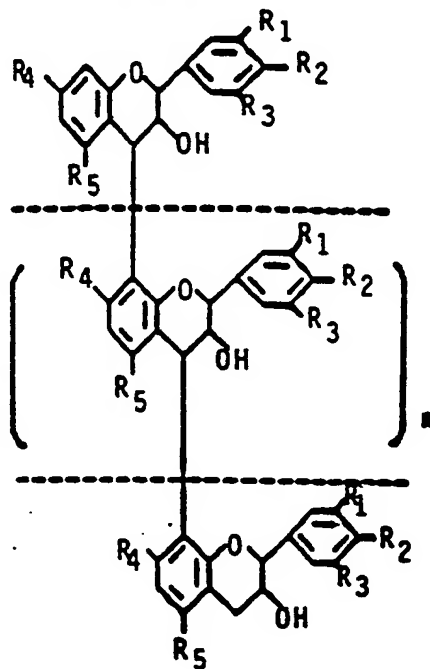
5/ Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle

comprend des proanthocyanidols de poids moléculaire environ  $45000 \pm 5000$ .

6/ Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisée en ce qu'elle comprend des proanthocyanidols de poids moléculaire environ  $5000 \pm 500$ .

7/ Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend des proanthocyanidols de poids moléculaire environ  $3000 \pm 300$ .

8/ Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elles comprennent des proanthocyanidols sous forme de polymères répondant à la formule suivante:



dans laquelle  $n$  est un entier supérieur ou égal à 3 et de préférence compris entre 3 et 350.

$R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  et  $R_5$  sont ensemble ou séparément, H, OH ou  $\text{OCH}_3$ , et de préférence en ce qu'il s'agit d'un polymère de procyanidol, dans lequel  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_4$  et  $R_5$  sont des groupements hydroxyle et  $R_3$  de l'hydrogène,

ou en ce qu'il s'agit de préférence un polymère de prodelphinidol dans lequel  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  et  $R_5$  sont des groupements hydroxyle ou en ce qu'il s'agit d'un polymère de promalvidol dans lequel  $R_1$  et  $R_3$  sont des groupements méthoxy et  $R_2$ ,  $R_4$  et  $R_5$  sont des groupements hydroxyles.

9/ Extrait végétal selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, tel qu'obtenu à partir d'un végétal choisi parmi les conifères tels que *Cupressus sempervirens*, *Pinus maritima*, les acacias, les mimosacées.

10/ Procédé pour la préparation d'une composition à base de proanthocyanidols à partir d'une partie de plante contenant des proanthocyanidols de PM supérieur à 2000 selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- décoction ou macération dans un alcool, notamment le méthanol ou l'éthanol, pour éliminer les polysaccharides notamment l'amidon.
- récupération des extraits hydroalcooliques et évaporation à sec, sous pression réduite, suivie éventuellement de lavage et récupération du résidu sec,
- reprise du résidu sec et filtration pour éliminer une partie de la fraction aromatique de l'extrait,
- extraction à contre-courant, à l'aide successivement d'au moins 3 solvants de polarité croissante, notamment l'éther éthylique, l'acétate d'éthyle, le butanol ou le méthanol notamment pour éliminer les essences aromatiques restant, la plus grande partie possible des oligomères de PM inférieur à 2000 et des monomères de proanthocyanidols et pour récupérer dans la phase alcoolique un extrait végétal contenant les

proanthocyanidols de poids moléculaire supérieur à 2000,

- le cas échéant, la purification de l'extrait obtenu pour éliminer les solvants restants.

11/ Procédé pour la préparation d'une composition à base de proanthocyanidols à partir d'une partie de plante contenant des proanthocyanidols de PM supérieur à 2000 selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- décoction ou macération dans un alcool, notamment le méthanol ou l'éthanol, pour éliminer les polysaccharides notamment l'amidon,

- ultrafiltration des solutions hydroalcooliques sur une membrane organique d'une porosité telle que son seuil de coupure serait de 20000 Daltons pour une protéine globulaire ultrafiltrée dans une solution aqueuse,

- récupération des extraits hydroalcooliques et évaporation à sec, sous pression réduite, suivie éventuellement de lavage et récupération du résidu sec,

12/ Procédé selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce que l'extrait végétal récupéré est concentré puis lyophilisé ou cristallisé.

13/ Procédé selon la revendication 10 ou la revendication 11, caractérisé en ce que la matière végétale initiale est constituée par des cônes de *Cupressus sempervirens*.

14/ Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle est non cytotoxique.

15/ Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, une quantité efficace d'au moins une composition de

45

proanthocyanidols selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable.

16/ Utilisation d'une composition de proanthocyanidols selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, pour la fabrication d'un médicament à activité anti-virale.

17/ Utilisation d'une composition de proanthocyanidols selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, pour la fabrication d'un médicament à activité anti-protéase.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/FR 90/00200

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) * According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. <sup>5</sup> A 61 K 35/78																				
<b>II. FIELDS SEARCHED</b> <div style="text-align: right; font-size: small;">Minimum Documentation Searched <sup>7</sup></div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; padding: 5px;">Classification System</td> <td style="padding: 5px;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl.<sup>5</sup></td> <td style="padding: 5px;">A 61 K</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; font-size: x-small; margin-top: 5px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *</div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl. <sup>5</sup>	A 61 K														
Classification System	Classification Symbols																			
Int.Cl. <sup>5</sup>	A 61 K																			
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>9</sup> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category *</th> <th style="width: 60%; padding: 5px;">Citation of Document, <sup>11</sup> with Indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup></th> <th style="width: 30%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. <sup>13</sup></th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">EP, a, 0216936 (TSUMURA JUNTENDO) 08 April 1987 see abstract; pages 3-5 ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-17</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">Patent Abstracts of Japan, volume 9, No. 59 (C-270) (1782), 15 March 1985, &amp; JP, A, 59196884 (NIPPON SHINYAKU K.K.) 08 November 1984 see the Abstract ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-17</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">Patent abstracts of Japan, volume 11, No. 242 (C-438) (2689), 7 August 1987, &amp; JP, A, 62048677 (NIPPON SHINYAKU CO. LTD) 3 March 1987 see the abstract ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-17</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">US, A, 4698360 (JACK MASQUELIER) 06 October 1987 see the whole document ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-17</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">Chemical Abstracts, volume 100, No. 16, 16 april 1984, (Columbus, Ohio, US),</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-17  ./...</td> </tr> </table>			Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with Indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>	X	EP, a, 0216936 (TSUMURA JUNTENDO) 08 April 1987 see abstract; pages 3-5 ---	1-17	X	Patent Abstracts of Japan, volume 9, No. 59 (C-270) (1782), 15 March 1985, & JP, A, 59196884 (NIPPON SHINYAKU K.K.) 08 November 1984 see the Abstract ---	1-17	X	Patent abstracts of Japan, volume 11, No. 242 (C-438) (2689), 7 August 1987, & JP, A, 62048677 (NIPPON SHINYAKU CO. LTD) 3 March 1987 see the abstract ---	1-17	X	US, A, 4698360 (JACK MASQUELIER) 06 October 1987 see the whole document ---	1-17	Y	Chemical Abstracts, volume 100, No. 16, 16 april 1984, (Columbus, Ohio, US),	1-17  ./...
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with Indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>																		
X	EP, a, 0216936 (TSUMURA JUNTENDO) 08 April 1987 see abstract; pages 3-5 ---	1-17																		
X	Patent Abstracts of Japan, volume 9, No. 59 (C-270) (1782), 15 March 1985, & JP, A, 59196884 (NIPPON SHINYAKU K.K.) 08 November 1984 see the Abstract ---	1-17																		
X	Patent abstracts of Japan, volume 11, No. 242 (C-438) (2689), 7 August 1987, & JP, A, 62048677 (NIPPON SHINYAKU CO. LTD) 3 March 1987 see the abstract ---	1-17																		
X	US, A, 4698360 (JACK MASQUELIER) 06 October 1987 see the whole document ---	1-17																		
Y	Chemical Abstracts, volume 100, No. 16, 16 april 1984, (Columbus, Ohio, US),	1-17  ./...																		
<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: x-small;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>																				
<b>IV. CERTIFICATION</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Date of the Actual Completion of the International Search   <div style="text-align: center;">13 July 1990 (13.07.90)</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Date of Mailing of this International Search Report   <div style="text-align: center;">09 August 1990 (09.08.90)</div> </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">           International Searching Authority   <div style="text-align: center;">EUROPEAN PATENT OFFICE</div> </td> <td style="padding: 5px;">           Signature of Authorized Officer         </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search  <div style="text-align: center;">13 July 1990 (13.07.90)</div>	Date of Mailing of this International Search Report  <div style="text-align: center;">09 August 1990 (09.08.90)</div>	International Searching Authority  <div style="text-align: center;">EUROPEAN PATENT OFFICE</div>	Signature of Authorized Officer														
Date of the Actual Completion of the International Search  <div style="text-align: center;">13 July 1990 (13.07.90)</div>	Date of Mailing of this International Search Report  <div style="text-align: center;">09 August 1990 (09.08.90)</div>																			
International Searching Authority  <div style="text-align: center;">EUROPEAN PATENT OFFICE</div>	Signature of Authorized Officer																			



II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	S.H. Misra et al.: "Pharmaceutical studies on starches of some zingiberaceous rhizomes", see pages 355, abstract 126823x, & Indian J. Pharm. Sci. 1983, 45(5), 216-20	
Y	<p>EP, A, 0025649 (OREWA INC.)  25 March 1981  see page 2, lines 14-25</p>	1-17

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9000200  
SA 35960

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 31/07/90  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

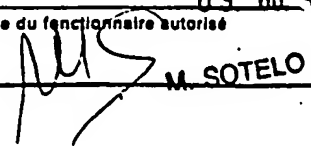
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0216936	08-04-87	JP-A- 61205272	11-09-86
		CH-A- 663153	30-11-87
		GB-A, B 2183640	10-06-87
		WO-A- 8605180	12-09-86
		NL-T- 8620077	02-02-87
		US-A- 4806659	21-02-89
-----			
US-A- 4698360	06-10-87	None	
-----			
EP-A- 0025649	25-03-81	AT-T- E5125	15-11-83
		CA-A- 1148864	28-06-83
		US-A- 4335110	15-06-82
-----			

EPC FORM P079

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 90/00200

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB <sup>5</sup> : A 61 K 35/78		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB <sup>5</sup>	A 61 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>*</sup>	Identification des documents cités, <sup>11</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	N° des revendications visées <sup>13</sup>
X	EP, A, 0216936 (TSUMURA JUNTENDO) 8 avril 1987 voir abrégé; pages 3-5 --	1-17
X	Patent Abstracts of Japan, volume 9, no. 59 (C-270)(1782), 15 mars 1985, & JP, A, 59196884 (NIPPON SHINYAKU K.K.) 8 novembre 1984 voir l'abrégé --	1-17
X	Patent Abstracts of Japan, volume 11, no. 242 (C-438)(2689), 7 août 1987, & JP, A, 62048677 (NIPPON SHINYAKU CO. LTD) 3 mars 1987 voir l'abrégé --	1-17
X	US, A, 4698360 (JACK MASQUELIER) 6 octobre 1987 voir le document en entier --	1-17
Y	Chemical Abstracts, volume 100, no. 16, 16 avril 1984, (Columbus, Ohio, US), ./.	1-17
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>*</sup> Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup></p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« &amp; » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
13 juillet 1990	09 08 90	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	 M. SOTELO	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
	S.H. Misra et al.: "Pharmaceutical studies on starches of some zingiberaceous rhizomes", voir page 355, abrégé 126823x, & Indian J. Pharm. Sci. 1983, 45(5), 216-20	
Y	-- EP, A, 0025649 (OREWA INC.) 25 mars 1981 voir page 2, lignes 14-25  -----	1-17

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9000200  
SA 35960

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 31/07/90  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0216936	08-04-87	JP-A- 61205272	11-09-86
		CH-A- 663153	30-11-87
		GB-A, B 2183640	10-06-87
		WO-A- 8605180	12-09-86
		NL-T- 8620077	02-02-87
		US-A- 4806659	21-02-89
-----			
US-A- 4698360	06-10-87	Aucun	
-----			
EP-A- 0025649	25-03-81	AT-T- E5125	15-11-83
		CA-A- 1148864	28-06-83
		US-A- 4335110	15-06-82
-----			

FFO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**